

Lab. Akkerbouw

1980-09-23

VERSLAG 80.73

Projekt: Normalisatie/harmonisatie analyse-  
methoden voor diervoeders en  
grondstoffen.

Onderwerp: Bepaling van ontsloten zetmeel  
in diervoeder grondstoffen (I).



Project: Normalisatie/harmonisatie analysemethoden voor diervoeders en grondstoffen.

Onderwerp: Bepaling van ontsloten zetmeel in diervoeder grondstoffen (I)

---

Doel:

Methode-ontwikkeling voor de bepaling van het gehalte aan ontsloten zetmeel.

Fase I: Vergelijkend onderzoek naar de verschillende inwerkingen van amyloglucosidase (AGS) en pancreatine op ontsloten en natieve graanprodukten bestemd voor diervoeding.

Samenvatting:

Aan de hand van progresscurven voor de beide enzymen onder verschillende proefomstandigheden werd de correlatie met de mate van ontsluiting bestudeerd.

Conclusie:

De pancreatine en AGS methode met 400 mg enzym gaven onderling de meest overeenkomstige resultaten. Er werd een duidelijk verband gevonden met de mate van ontsluiting.

Vergelijkend onderzoek met 400 mg van beide enzymen in meerdere zetmeelrijke diervoeders zal nog verricht moeten worden.

---

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse  
Medewerker/Samensteller: M.L. Essers

### Inleiding:

In de veevoederhandel wordt gebruik gemaakt van verschillende methoden voor de bepaling van "verteerbaar zetmeel". Door de verschillende methoden zijn de gegevens van de fabrikanten onderling niet goed vergelijkbaar. Om hieraan een einde te maken wordt gewerkt aan de normalisatie van een analysemethode waarmee de mate van ontsluiting kan worden bepaald.

In dit onderzoek wordt de werking van twee enzymen met elkaar vergeleken voor produkten die een verschillende zetmeelontsluitende behandeling hebben ondergaan. De amyloglucosidase methode gaf veel lagere gehalten dan de pancreatine methode.

### Materiaal:

Het onderzoek werd gedaan op de volgende monsters:

- Tapioca natief - CHV.
- Tapioca ontsloten - Granaria.
- Mais natief - Granaria.
- Mais ontsloten - Granaria.
- Mais ontsloten - Wessanen.

Amyloglucosidase (AGS) van Merck (nr. 1330) aktiviteit: 70 IE.

Pancreatine van Organon te Oss (Dyosynth C) aktiviteit 143 E (1 E = die hoeveelheid enzym die bij de pancreatine proefomstandigheden, 40°C en pH 6,8 gemiddeld per minuut 1 umol dextrose equivalenten (maltose) uit zetmeel vrijmaakt, gemeten over 15 min, uitgaande van zetmeel volgens Zulkowsky 3 gr/100 ml).

### Methoden:

De proeven met AGS werden uitgevoerd op basis van het analysevoorschrift van Wessanen (Bijlage 1).

Wijzigingen: in plaats van magnetische roerder werd gebruik gemaakt van een schudwaterbad (250 rpm).

Variabel gekozen: incubatietijd en hoeveelheid enzym.

De proeven met pancreatine werden uitgevoerd op basis van CLO voorschrift (Bijlage 2).

Wijzigingen: Er werd geïncubeerd in schudwaterbad bij 40°C (250 rpm).

De reactie werd gestopt met 1 ml 4 N NaOH.

Variabel gekozen: incubatietijd, hoeveelheid enzym en al dan niet hydrolyseren met zoutzuur na de incubatie.

Het gehalte aan totaal zetmeel werd bepaald volgens NEN 3574. Zie bijlage 8.

De incubatietijden waren voor alle proeven 15, 30 en 60 minuten.

De blankobepalingen werden uitgevoerd met enzym maar zonder monster.

De Luff-Schoorl resultaten werden afgelezen op de glucose tabel. Alleen ingeval niet gehydrolyseerd werd met HCl werd afgelezen op de maltose tabel. (Tabel I en III kolom 3.)

Berekening:

1). ml Luff verbruikt  $\hat{=}$  mg glucose

2). mg glucose . verdunning = x

$$\frac{x \cdot 0,9}{1000} = \text{gr zetmeel}$$

3).  $\frac{\text{gr zetmeel} \cdot 100}{\text{afgewogen}} \cdot \frac{100}{(100-\text{vocht})} \cdot \frac{100}{\text{totaal zetmeel}} = \text{quotient "ontsloten" zetmeel en totaal zetmeel maal 100}$   
(ontsluitingsgetal berekend op droge stof).

Resultaten:

De resultaten staan vermeld in tabel I.

Toelichting tabel I

kolom 1: Toegevoegd 400 mg Pancreatine.

Na incubatie werd met HCl geïnverteerd.

kolom 2: Toegevoegd 400 mg AGS.

kolom 3: Toegevoegd 1560 E Pancreatine volgens maltose tabel. Er werd niet met HCl geïnverteerd. Daar Pancreatine alleen maltose vormt werden de resultaten verkregen m.b.v. de maltose tabel van Luff-Schoorl.

kolom 4: Toegevoegd 1560 E Pancreatine volgens maltose tabel. Er werd nu echter wel met HCl geïnverteerd.

kolom 5: Toegevoegd 1000 IE AGS.

kolom 6: Om AGS en Pancreatine nog eens exacter te vergelijken werd een proef uitgevoerd met 1000 E Pancreatine volgens maltose tabel. Er werd niet met HCl geïnverteerd. Berekening m.b.v. maltose tabel Luff-Schoorl.

#### Overige resultaten:

In de twee monsters die gebruikt waren voor de proef met 1000 E Pancreatine (kolom 6) werd ook enzymatisch glucose, fructose en maltose bepaald. Er werd een lichte toename van glucose en fructose gemeten ten opzichte van de incubatie bij  $t = 0$ . Zie tabel IV.

Alle waarden vermeld in tabel I kunnen gecorrigeerd worden met de nulwaarden vermeld in tabel II. De nulwaarde is het gehalte aan glucose, fructose en saccharose in het oorspronkelijk monster. Voor de bepaling van totaal zetmeel werd een alcohol extractie toegepast. De vraag is of de "nulwaarde" suikers tot ontsloten zetmeel gerekend moet worden. Zo ja, dan dient niet gecorrigeerd te worden.

De voor de nulwaarde gecorrigeerde resultaten staan vermeld in tabel III.

De voor de nulwaarde gecorrigeerde resultaten werden weergegeven in progresscurven zie bijlage 3 t/m 7.

#### Bespreking van de resultaten:

1 De verkregen waarde met 400 mg pancreatine en 400 mg AGS zijn van dezelfde grootte.



- 2 Pancreatine 400 mg grijpt natieve mais veel sterker aan dan AGS 400 mg.
- 3 De invloed van de andere enzymen in pancreatine (protease/lipase) op de zetmeel afbraak kan een verklaring zijn voor het "agressievere" gedrag van pancreatine.
- 4 De zoutzuurhydrolyse doet meer dan alleen de hydrolyse van maltose tot glucose (factor ca. 1,2).
- 5 De aktiviteit van AGS is iets minder geweest dan 1000 IE omdat de aktiviteit gemeten werd bij 60°C en de analyses werden uitgevoerd bij 50°C.
- 6 De waarden van kolom 3, 5 en 6 van tabel III komen ons inziens niet overeen met de veel hogere verteerbaarheidsresultaten bij babybiggen. De methoden met 400 mg enzym zijn daarmee beter in overeenstemming en verdienen de voorkeur voor verder onderzoek in meerdere produkten.
- 7 Enzymatische bepaling van het maltose gehalte (tabel IV) laat zien dat zodra pancreatine met het zetmeelsubstraat gebonden is, de zetmeelketen gehydrolyseerd wordt tot het eindprodukt maltose.

		1	2	3	4	5	6
ontsluitingsgetal	Totaal zetm.	400 mg	1560 E			1000 IE	1000 E
	op d.s	Pancr/HCl	AGS	Pancr	Pancr/HCl	AGS	Pancr
Tapioca CHV	62,2						
15 min		53,7	50,4	37,9	46,5		30,3
30 min		63,0	56,9	45,0	52,7		37,6
60 min		72,1	62,0	52,4	58,8		44,4
Tapioca ontsloten Granaria	81,8						
15 min			95,3	58,2	74,3		46,8
30 min			94,7	64,4	79,6		56,4
60 min			95,3	68,2	83,5		62,4
Mais natief Granaria	67,9						
15 min		37,3	16,4		20,1	10,7	
30 min		48,4	18,6		27,8	16,4	
60 min		65,3	27,5		38,7	21,7	
Mais ontsloten Granaria	69,6						
15 min		80,9	67,6		53,3	31,3	
30 min		83,6	76,2		66,2	47,4	
60 min		90,4	81,8		76,1	55,6	
Mais ontsloten Wessanen	69,8						
15 min			87,7	52,4	66,2		
30 min			91,2	58,6	70,5		
60 min			90,7	63,0	75,8		



Tabel II

Nulwaarde berekend op de droge stof

	% glucose	% fructose	% saccharose
Tapioca natief CHV	0,94	1,32	0,19
Tapioca ontsloten Granaria	0,93	0,99	2,10
Mais natief Granaria	0,47	0,27	0,52
Mais ontsloten Granaria	0,34	0,27	1,08
Mais ontsloten Wessanen	0,43	0,26	1,65

De nulwaarde voor saccharose moet alleen afgetrokken worden indien gehydrolyseerd wordt met HCl.

(Tabel I gecorrigeerd met de waarde uit tabel II)

Tabel III

	1	2	3	4	5	6
ontsluitingsgetal	400 mg		1560 E		1000 IE	1000 E
	Pancr/HCl	AGS	Pancr	Pancr/HCl	AGS	Pancr
Tapioca CHV						
15 min	49,7	46,7	34,2	42,5		26,6
30 min	59,0	53,2	41,3	48,7		33,9
60 min	68,1	58,3	48,7	54,8		40,7
Tapioca ontsloten Granaria						
15 min		92,9	55,8	69,4		44,4
30 min		92,3	62,0	74,7		54,0
60 min		92,9	65,8	78,6		60,0
Mais natief Granaria						
15 min	35,4	15,3		18,2	9,6	
30 min	46,5	17,5		25,9	15,3	
60 min	63,4	26,4		36,8	20,6	
Mais ontsloten Granaria						
15 min	78,5	66,8		50,9	30,5	
30 min	81,2	75,4		63,8	46,6	
60 min	88,0	81,0		73,7	54,8	
Mais ontsloten Wessanen						
15 min		86,7	50,4	62,8		
30 min		90,2	57,6	67,1		
60 min		89,7	62,0	72,4		

Tabel IV

Enzymatische bepaling glucose, fructose en maltose na incubatie met 1000 E pancreatine zonder hydrolyse met HCl (berekend op de droge stof).

Tapioca CHV

incubatielijd	% glucose	% fructose	% maltose
15 min	1,3	1,3	14,7
30 min	1,5	1,4	18,6
60 min	1,7	1,4	22,4

Tapioca ontsloten Granaria

incubatielijd	% glucose	% fructose	% maltose
15 min	1,1	0,7	34,1
30 min	---	---	46,1
60 min	---	---	51,1

Verzendlijst: Van Doesburgh,  
adj. directeur,  
sektorhoofden (3x),  
dir. V.K.A.,  
leesportefeuille (5x),  
Normalisatie,  
projektbeheer,  
Muuse (3x),  
Hollman,

WESSANEN NEDERLAND B.V. - Centraal laboratorium

1. Titel

Bepaling van de mate van ontsluiting van behandelde zetmeelprodukten met behulp van amyloglucosidase.

2. Toelichting

De mate van ontsluiting van zetmeel wordt bepaald door, na inwerking van het enzym amyloglucosidase, de hoeveelheid gevormde glucose te meten.

3. Toepasbaarheid

De methode is toepasbaar voor verschillende zetmeelhoudende produkten (zoals bijv. mais, tarwe, gerst en tapioca), waarbij de uitkomsten per produkt moeten worden beoordeeld.

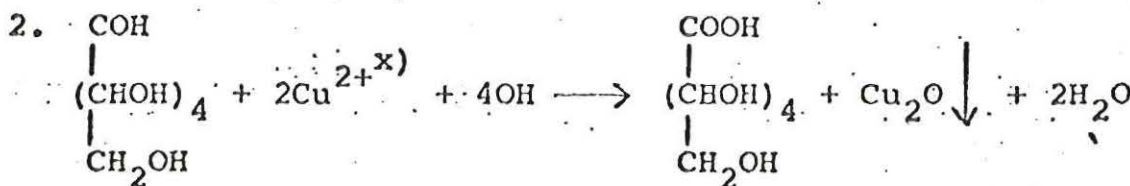
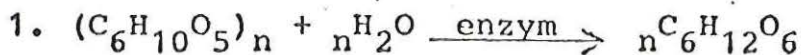
4. Definitie

4.1. Onder de mate van ontsluiting wordt verstaan het gehalte aan zetmeel dat wordt omgezet in glucose door middel van het enzym amyloglucosidase onder de volgende omstandigheden : pH = 4,6, temperatuur 50°C, enzymconcentraat 1000 eenheden/gram, inwerktijd 30 minuten.

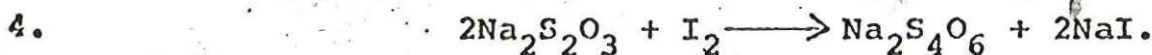
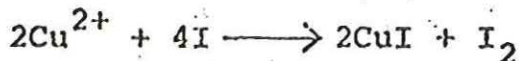
4.2. Eén eenheid amyloglucosidase is die hoeveelheid enzym, die bij 60°C en pH = 4,6 gemiddeld per minuut 1 µmol glucose uit zetmeel vrijmaakt, gemeten over 15 minuten en uitgaande van zetmeel volgens Zulkowsky, 3 gram/100 ml.

5. Principe

Het analysemateriaal wordt bij pH = 4,6 en bij 50°C gedurende 30 minuten onder constant roeren geïncubeerd met een nauwkeurig vastgestelde hoeveelheid amyloglucosidase van bekende activiteit (9.1). Het gehalte aan gevormd glucose wordt bepaald met behulp van het reagens van Luff-Schoorl.



3. resterend  $\text{Cu}^{2+}$



x) koper complex gebonden als kopernatriumcitraat  $\text{Na}_6\text{Cu}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2$



6. Reagentia/hulpstoffen; pro analyse kwaliteit

Indien niet anders is aangegeven worden de oplossingen in gedestilleerd water bedoeld.

6. 1. Amyloglucosidase-oplossing (voor sterktebepaling).  
75 mg amyloglucosidase / 250 ml acetaatbuffer (6.3) vers bereid.
6. 2. Amyloglucosidase-oplossing. Los zoveel amyloglucosidase (Merck art. nr. 1330) op in acetaatbuffer (6.3) als overeenkomt met 1000 eenheden/ml. Voor gebruik vers bereiden.
6. 3. Acetaatbuffer pH = 4,6 : meng 510 ml azijnzuur 0,1M met 490 ml natriumacetaatoplossing 0,1 M.
  - 6.3.1. Azijnzuur 0,1M
  - 6.3.2. Natriumacetaatoplossing 0,1M.
6. 4. Zwavelzuur 6N.
6. 5. Zetmeel volgens Zulkowsky 3 % oplossing.
6. 6. Natriumhydroxyde-oplossing 0,25N.
6. 7. Kaliumhexacyanoferraat (II)-oplossing 0,25M (Carrez I).
6. 8. Zinkacetaatoplossing 1M in azijnzuur 0,5M (Carrez II).
6. 9. Kaliumjodide-oplossing 12 %.
- 6.10. Reagens van Luff-Schoorl.

Weeg af :

- 86,2 gram watervrij Natriumcarbonaat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- 31,3 gram Natriumbicarbonaat,  $\text{NaHCO}_3$
- 70,0 gram Trinatriumcitraat,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- 25,0 gram Kopersulfaat (fijn kristallijn of gepoederd),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Meng de droge zouten goed en los het mengsel onder voortdurend roeren op in 800 ml gedestilleerd water, dat niet warmer dan  $40^\circ\text{C}$  mag zijn. Om snel op te lossen kan men een trilroerder gebruiken. Koel zo nodig af tot  $20^\circ\text{C}$  en vul met gedestilleerd water aan tot 1 liter.

Het water vrije Natriumcarbonaat moet van tevoren op gehalte worden gecontroleerd. Zo nodig corrigeert men daarna de af te wegen hoeveelheid Natriumcarbonaat.

Het reagens van Luff-Schoorl moet na verdunning 1 op 50 een pH hebben van  $10,0 \pm 0,2$

De werkzaamheid van het reagens kan als volgt worden gecontroleerd :

Los op 9,500 gram zuivere saccharose in gedestilleerd water in een maatkolf van 500 ml. Vul aan en meng.

Pipetteer hiervan 50 ml in een maatkolf van 500 ml. Voeg 15 ml 0,1N zoutzuur toe. Breng de kolf met inhoud in een kokend waterbad en houd hem gedurende 30 minuten (te rekenen vanaf het ogenblik dat het water weer kookt) in het water. Koel daarna af tot  $+ 20^\circ\text{C}$ . Neutraliseer met 15 ml natronloog 0,1N. Vul aan en meng. Bepaal in 25 ml van deze oplossing de reducerende suiker met het reagens van Luff-Schoorl. De reductie moet overeenkomen met  $19,0 \pm 0,1$  ml  $\pm$ thiosulfaat 0,1N.



6.11. Natriumthiosulfaatoplossing 0,1N.

6.12. Stijfseloplossing 0,5 %.

6.13. Puimsteenkorrels, uitgekookt met zoutzuur, gewassen met gedestilleerd water en gedroogd.

6.14. Phenolphthaleïne-oplossing 1 % in ethanol (geëutraliseerd met 0,1N NaOH).

## 7. Apparatuur

7.1. Balans met ten minste een nauwkeurigheid van  $\pm 1$  mg.

7.2. Waterbad met thermostaat met nauwkeurigheid van  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ .

7.3. Plaat met ten minste 6 magneetroerders die onder waterbad (7.2) kan worden geplaatst.

7.4. Roermagneetjes, liefst met hetzelfde volume (9.2.1. en 10.3), lengte ca. 25 mm,  $\varnothing$  ca. 6 mm, volume ca. 0,75 cm<sup>3</sup>.

7.5. Chronometer.

7.6. Metalen brandergaasjes, voorzien van een asbestplaat met cirkelvormige opening, waarin de bodems van konische kolven van 300 ml juist passen.

## 8. Monster

Maal het monster op een Peppinkmolen over een zeef van 0,6 mm.

## 9. Werkwijze

9.1. Bepaling van de activiteit van het enzym (zie 11).

Pipetteer in een erlenmeyer van 300 ml : 10 ml zetmeeloplossing 3 % (6.5) en 10 ml buffer pH = 4,6 (6.3) en plaats de erlenmeyer onder constant roeren in een waterbad van 60°C. Voeg na 20 minuten 0,5 ml amyloglucosidase-oplossing (6.1) met behulp van een automatisch pipet toe en incubeer gedurende precies 15 minuten (tijd en temperatuur nauwkeurig aanhouden).

Stop de reactie door 25,0 ml Luff-Schoorl reagens toe te voegen, haal de erlenmeyer uit het waterbad en vul aan met water tot ca. 50 ml.

Voer ook een blanco bepaling uit (als boven omschreven, echter zonder toevoeging van 0,5 ml amyloglucosidase-oplossing), daar het zetmeel volgens Zulkowsky reducerende bestanddelen kan bevatten.

Werk verder als omschreven onder "Bepaling van het Glucosegehalte" (9.2.2) vanaf "verhit, na toevoeging van een paar kooksteentjes, uit de hand . . . etc."

## 9.2. Aantasting

### 9.2.1. Hydrolyse van het zetmeel.

Weeg af 1 gram van het monster, op 1 mg nauwkeurig en breng de afgewogen stof in een maatkolf van 100 ml. Voeg toe 1 roermagneetje (7.4) en 50 ml buffer (6.3) en plaats het kolfje direct na de toevoeging van de buffer in een waterbad van 50°C (7.2) die op een plaat met magnetische roerders (7.3) is geplaatst. Laat, onder constant roeren, 15 minuten opwarmen. Voeg hierna 1 ml amyloglucosida oplossing (1000 eenheden/ml) (6.2) toe met een automatische pipet en incubeer onder constant roeren gedurende precies 30 minuten (tijd en temperatuur nauwkeurig aanhouden).

Stop de enzymatische hydrolyse door 3 ml  $H_2SO_4$  6N (6.4) toe te voegen en het kolfje direct in een koelbad te plaatsen. Voeg na afkoelen tot ca. 20°C toe 1 ml Carrez I (6.7) en schud 1 minuut; voeg dan 1 ml Carrez II (6.8) toe en schud weer 1 minuut. Vul aan met water, meng en filtreer. Voer ook een blanco bepaling uit (als boven omschreven, echter zonder 1 gram monster).

### 9.2.2. Bepaling van het glucosegehalte.

Pipetteer 10 ml van het filtraat, dit volume mag ten hoogste 60 mg reducerende suiker (berekend als glucose) bevatten, in een erlenmeyer van 300 ml en neutraliseer met 0,25N NaOH (6.6) op phph. (6.14). Voeg toe 25,0 ml van het reagens van Luff-Schoorl (6.10) en vul aan met water tot ca. 50 ml.

Verhit, na toevoeging van een paar kooksteentjes (6.13), uit de hand boven een vrije vlam in ongeveer 2 minuten tot koken. Plaats daarna de kolf onmiddellijk op een gereedstaand draadgaas met isolerende ring (7.6), waaronder tevoren een vlam is aangestoken, zodanig, dat de kolf alleen aan de onderzijde wordt verhit en sluit vervolgens aan op een terugvloeikoeler. Kook vanaf dit ogenblik gerekend gedurende precies 10 minuten. Koel direct af in een waterbad, waarbij schudden moet worden vermeden.

Voeg toe 25 ml KJ 12 % (6.9) en voorzichtig 25 ml  $H_2SO_4$  6N (6.4). Titreer het vrijgekomen jodium met natriumthiosulfaat-oplossing 0,1N (6.11), op het eind met stijfseloplossing 0,5 % (6.12) als indicator, tot roomgeel.

## 9.3. Bepaling totaal zetmeelgehalte volgens E.E.G.-methode, De blanco dient een waarde omstreeks 0 te hebben.



## 10. Berekening

- 10.1. Zoek in de bijgevoegde tabel op met hoeveel mg glucose het verschil tussen blanco bepaling en de proef overeenkomt. (De tabel is gebaseerd op 0,1000N thio.)
- 10.2. Berekening van de activiteit van het enzym (volgens 9.1). De amyloglucosidase-activiteit in  $\mu\text{mol}$  glucose per mg amyloglucosidase per minuut wordt berekend uit de formule :

$$\text{Eenheden per mg (E/mg)} = \frac{g \cdot 10^3}{180 \cdot 15 \cdot a}$$

waarin : g = aantal mg glucose uit de titratie gevonden

a = de hoeveelheid amyloglucosidase (in mg) aan het incubatiemengsel toegevoegd.

### 10.3. Berekening van het gehalte aan gehydrolyseerd zetmeel (volgens 9.2)

Bereken het gehalte aan ontsloten zetmeel na 30 minuten in procenten op totaal zetmeel uit de formule :

$$\% = \frac{1000 \times g \times 0,9}{a \times v \times z} \times \frac{100 - r}{100}$$

waarin : a = afgewogen hoeveelheid monster in grammen

g = aantal mg glucose uit de titratie gevonden

v = het voor de titratie gepipetteerde volume in ml

r = volume roermagneetje in ml

z = totaal % zetmeel in het monster volgens E.E.G.-methode.

## 11. Opmerkingen

In verband met de minder goede nauwkeurigheid van de sterktebepaling dient deze minstens in 4-voud (+ 2 blanco's) te worden uitgevoerd.

N.B. De verschillen, die bij de sterktebepaling worden gevonden, resulteren overigens in aanzienlijk geringere verschillen bij de aantastingsbepaling.

Bijlage : 1 tabel

6-7-1979

0,1 n thio-  
sulfaat-  
oplossing

glycose,  
fructose of  
invertsuker  
 $C_6H_{12}O_6$

lactose  
 $C_{12}H_{22}O_{11}$

maltose  
 $C_{12}H_{22}O_{11}$

cm <sup>3</sup>	mg	verschil	mg	verschil	mg	verschil
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	4,0
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3
19	50,0	3,0	71,7	4,0	75,5	4,4
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2		88,0		94,6	

1. Onderwerp

Dit voorschrift beschrijft de bepaling van ontsloten zetmeel en ruwe totaal suiker in zetmeelpreparaten, veevoedergrondstoffen, mengvoeders en kunstmelkpreparaten.

2. Definitie

Het gehalte ontsloten of verteerbaar zetmeel is het percentage van het in behandeling genomen monster dat, zonder voorafgaande behandeling met stoom onder verhoogde druk, volgens de beschreven methode bepaald wordt als glukose, vermenigvuldigd met de faktor 0,9.

Het gehalte ruwe totaal suiker is het percentage van het in behandeling genomen monster dat, zonder voorbehandeling met stoom en zonder incubatie met pancreatine, volgens de beschreven methode omgezet en bepaald wordt als glukose.

3. Beginsel

Het te analyseren monster wordt gesuspenderd in een bufferoplossing en daarna geïncubeerd met het enzympreparaat pancreatine. Dit preparaat bevat o.a.  $\alpha$ -amylase dat zetmeel afbreekt tot maltose. De ontstane maltose wordt met zoutzuur omgezet in glukose en deze wordt enzymatisch bepaald.

Alleen dat deel van het zetmeel dat niet in intacte zetmeelkorrels is ingesloten wordt door het pancreatine omgezet.

4. Reagentia

- Gedestilleerd of gedemineraliseerd water.
- Pancreaspoeder type C, merk Diosynth, Oss.
- Bufferoplossing volgens Sørensen, pH 6,8. Weeg daartoe 9,078 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  af, los op in water en vul aan tot 1 l. Weeg daarnaast 11,876 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  af en los dit ook op in 1 l water. Meng van beide oplossingen gelijke delen.
- NaCl-oplossing 0,2 m.
- Carrez-I-oplossing: Los 106 g  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (kaliumhexacyanoferraatII) op in water en vul aan tot 1 l (0,25 m).
- Carrez-II-oplossing: Zinkacetaatoplossing in azijnzuur. Los daartoe 219,5 g  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 30 g ijsazijn op in 1 l water.
- NaOH 4 n.
- HCl 25 %.
- Fenolftaleïne-indicator.
- Tris-zoutzuurbuffer, pH 7,0 (0,4 m). Weeg daartoe 48,8 g Tris af en voeg HCl 3 n toe tot pH 7,0 (registreren met pH-meter). De toe te voegen hoeveelheid is  $\pm 100$  ml. Vul met gedestilleerd water aan tot 1 l.



Testcombinatie bloedsuiker GOD-Pepid, Boehringer Mannheim. Vul flesje 2: van de testcombinatie aan met Tris-zoutzuurbuffer i.p.v. met gedestilleerd water.

### Uitvoering

Weeg 1 g monster op 1 mg nauwkeurig af in een maatkolf van 250 ml. Voeg achtereenvolgens 6 ml water, 40 ml bufferoplossing pH 6,8 en 4 ml NaCl-oplossing 0,2 M toe. Meng de oplossing en voeg 400 mg pancreaspoeder toe. Incubeer het mengsel in een broedstoof bij 38-40°C gedurende 1 uur (zie opm. 2). Laat daarna afkoelen.

Weeg voor de bepaling van ruwe totaal suiker eveneens 1 g af in een maatkolf van 250 ml. Voeg 40 ml water toe. Voeg zowel aan de geïncubeerde als de niet-geïncubeerde oplossing achtereenvolgens 5 ml Carrez-I en 5 ml Carrez-II toe om eiwitten neer te slaan (klaren). Schud na iedere toevoeging gedurende 1 min. goed om. Neutraliseer de oplossingen met NaOH 4 N op fenolftaleïne tot rose. Voeg daarna voorzichtig enkele druppels HCl 25 % toe tot de kleur naar wit omslaat. Voeg daarna nog 2 druppels extra toe. Vul met water aan tot de maatstreep en meng de oplossing. Filtreer door een vouwfilter (S en S, nr. 595½, diameter 240 mm). Pipetteer van het heldere filtraat 25 ml in een erlenmeyer van 300 ml. Voeg 3 ml HCl 25 % toe en kook gedurende 1½ uur aan een terugvloeiakoeler. Breng de oplossing kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml en vul aan tot de maatstreep. Meng de oplossing goed en maak eventueel een verdere verdunning tot een concentratie van 20 à 60 mikrogramglukose per ml. Werk verder volgens het voorschrift voor totaal zetmeel.

### Berekening

Als m = massa van het monster in grammen

a = de op de ijklijn afgelezen concentratie van de gemeten oplossing in mikrogram/ml

b = de op de ijklijn afgelezen concentratie van de blanco

X = de faktor waarmee de oplossing van 250 ml uiteindelijk verdund

is alvorens de extinktie-meting werd verricht,

dan is de som van ontsloten zetmeel en suikers, voorzover de laatste aanleiding geven tot de vorming van glukose:

$$(a-b) \cdot X \cdot 250 \% \quad (A)$$

m. 10.000

Als verder na de bepaling zonder incubatie met pancreatine:

c = de op de ijklijn afgelezen concentratie van de gemeten oplossing in mikrogram/ml.

d = de op de ijklijn afgelezen concentratie van de blanco dan is het percentage ruwe totaal suiker, uitgedrukt als glukose  $(c-d) \cdot X \cdot 250 \% \quad (B)$

m. 10.000



Het percentage ontsloten zetmeel is dan 0,9 (A-B).

#### Opmerkingen

- 1) Indien er verwacht kan worden dat er in een monster lagere koolhydraten aanwezig zijn die met de beschreven procedure geen aanleiding tot de vorming van glukose geven dan is de aangewezen weg een eindbepaling volgens Luff-Schoorl. Er zal dan wel meer monster ingewogen moeten worden en het inversiemengsel moet dan met loog ongeveer geneutraliseerd worden, alvorens gepipetteerd wordt voor de Luff-bepaling.
- 2) Het is van belang dat de incubatietijd vrij nauwkeurig tot 1 uur beperkt blijft. Soms is  $\alpha$ -amylase nl. ook in staat om zetmeel uit intacte zetmeelkorrels tendele vrij te maken.



Tapioca CHU

1. 400 mg pancr / HCL.
2. 400 mg AGS.
3. 1560 E pancr / HCL.
4. 1560 E pancr.
5. 1000 E pancr.

↑ ontstervingsgetal  
100

90  
80  
70  
60  
50  
40  
30  
20  
10

15

30

45

60

→ incubatietijd.

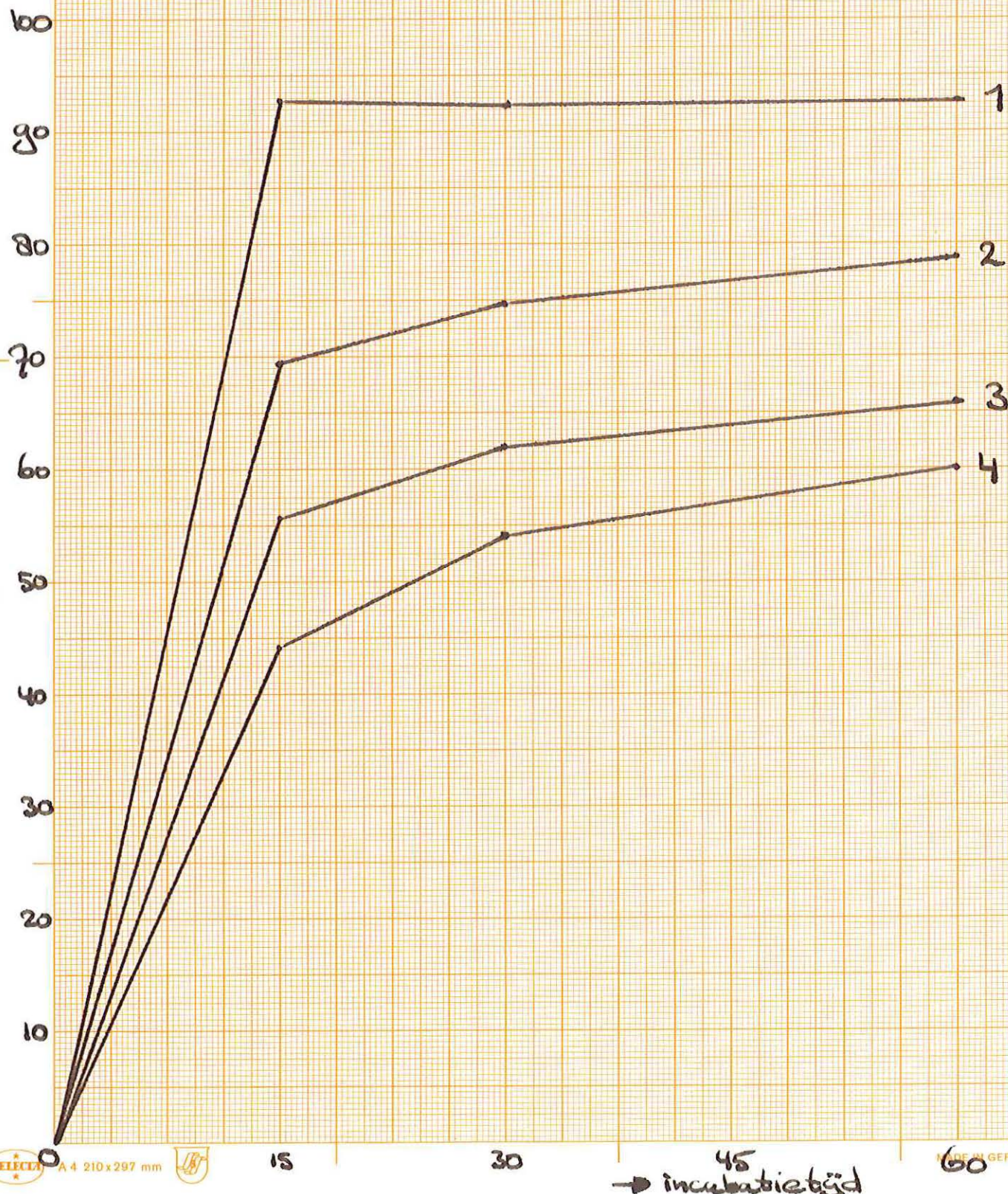
1  
2  
3  
4  
5



# Tapioca ontsloten Granaria.

1. 400 mg AGS
2. 1560 E pancr / HCL.
3. 1560 E pancr.
4. 1000 E pancr.

↑ ontsluitingsgetal.





Mais natief Granaria.

↑ ontduitsgetal.  
100

1. 400 mg Pance/HCl.
2. 1500 E Pance/HCl.
3. 400 mg AQS.
4. 1000 IE AQS.

90

80

70

60

50

40

30

20

10

0

15

30

45

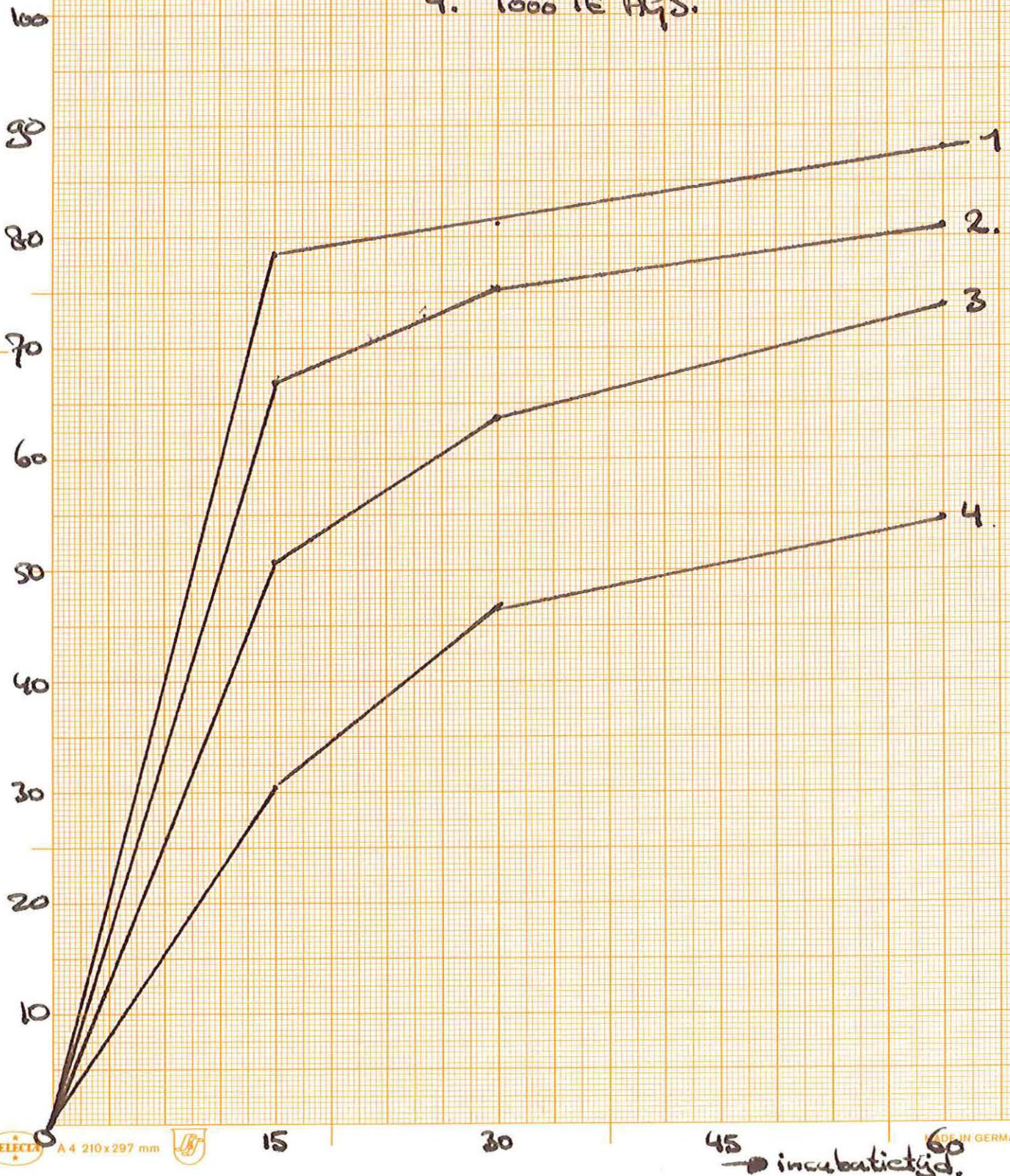
60

→ incubatietijd



mai's ontsloten Granazia.

1. 400 mg Pance / HCL.
2. 400 mg AGS.
3. 1560<sup>E</sup> pance / HCL.
4. 1000 IE AGS.

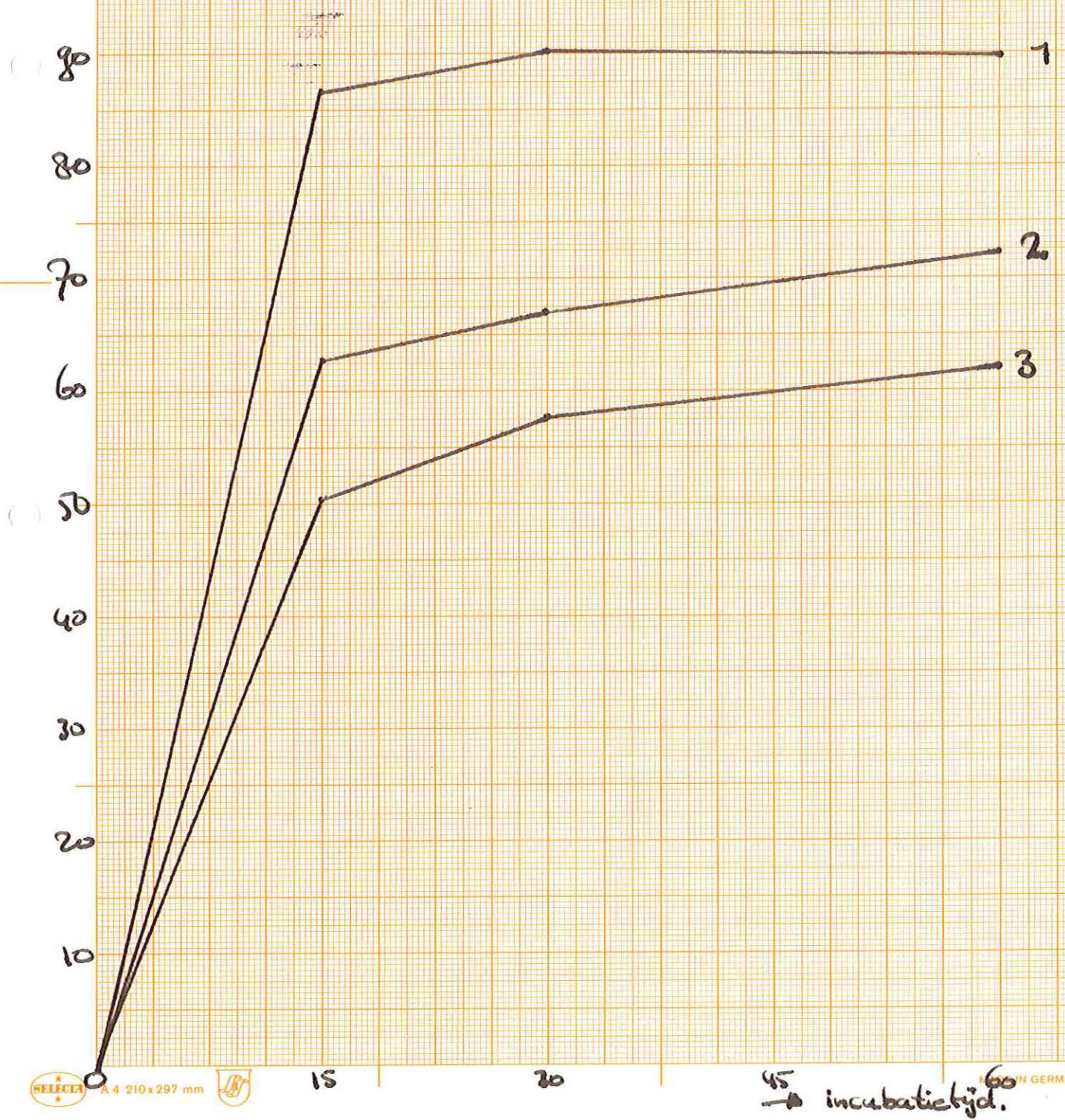




maïs ontsloten wessanen

1. 400 mg AFS.
2. 1560 E pancr. / HCl.
3. 1560 E pancr.

↑ ontsluitingsgetal.  
100





Onderzoeksmethoden voor veevoeders  
 BEPALING VAN HET GEHALTE AAN ZETMEEL  
 (MET BEHULP VAN ENZYMATISCHE HYDROLYSE)

Ontwerp NEN 3324

Test methods for feeding stuffs  
 Determination of the starch content (by enzymatic hydrolysis)

augustus 1963

Kritiek vóór 1 december 1963

## 1. Onderwerp

Deze methode beschrijft een procedure voor de bepaling van het gehalte aan zetmeel in veevoeders met behulp van enzymatische hydrolyse.

## 2. Toepassingsgebied

De norm is van toepassing bij het onderzoek van veevoeders en veevoedergrondstoffen.

## 3. Definitie

Gehalte aan zetmeel: de hoeveelheid zetmeel en die hoogmoleculaire afbraakprodukten hiervan die onoplosbaar zijn in ethanol 40% (V/V).

## 4. Beginsel

Uit de te onderzoeken stof worden de in ethanol 40% (V/V) oplosbare suikers geëxtraheerd.

Na ontsluiting onder druk wordt het zetmeel gehydrolyseerd door het enzym amyloglucosidase (glucamylase).

De gevormde glucose wordt bepaald met het reagens van Luff-Schoorl.

## 5. Analysemonster

Bereid het analysemonster overeenkomstig de richtlijnen vermeld in NEN 3328, met dien verstande, dat de te onderzoeken stof een draadzeef van 500  $\mu$ m (NEN 2560) geheel passeert.

## 6. Reagentia en hulpstoffen

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn. Gebruik gedestilleerd water of water van ten minste gelijke zuiverheid. Indien niet anders is aangegeven, worden oplossingen in water bedoeld.

## 6.1 Ethanol 40% (V/V), geneutraliseerd t.o.v. fenolftaleïne.

## 6.2 Acetaatbuffer pH 4,6: meng 51 ml azijnzuur 2 M met 49 ml natriumacetaatoplossing 2 M.

6.2.1 Azijnzuur 2 M, d.i. 120 g  $C_2H_4O_2$  per l.6.2.2 Natriumacetaatoplossing 2 M, d.i. 272 g  $NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$  per l.6.3 Amylo  $\alpha$ -1,4- $\alpha$ -1,6 glucosidase of glucamylase, een uit micro-organismen bereid enzympreparaat van bekende zuiverheid.

De activiteit van het enzym dient te worden gecontroleerd volgens 6.3.2.

## 6.3.1 Het enzym amyloglucosidase (glucamylase) moet vrij zijn van de enzymen fosforylase en transglucosidasen.

Wanneer amyloglucosidase in vaste vorm gestabiliseerd is met een reducerende suiker, verricht dan een blancobepaling met alle reagentia maar zonder analysemateriaal.

### 6.3.2 Bepaling van de activiteit van amylo $\alpha$ -1,4- $\alpha$ -1,6 glucosidase

#### a. Definitie van de activiteit

Een eenheid amyloglucosidase is die hoeveelheid enzym, die bij pH 4,6 en bij de opgegeven optimale werkteemperatuur in 1 min 1  $\mu$ mol glucose uit zetmeel volgens Zulkowsky (30 g/l) vrijmaakt,  $\mu$ mol glucose / min

#### b. Bereiding van de enzymoplossing

Los op, of verdun met 10x verdunde acetaatbuffer (6.2) pH 4,6 zoveel enzym, dat de oplossing ongeveer 20 eenheden per ml bevat.

#### c. Hydrolyse

Pipetteer in een conische kolf van 300 ml: 10,0 ml 10x verdunde acetaatbuffer en 10,0 ml zetmeeloplossing 30 g/l (6.14).

Plaats de kolf in een waterbad en breng de inhoud onder herhaald schudden op de opgegeven optimale werkteemperatuur van het enzym.

Voeg vervolgens toe 0,2 ml amyloglucosidase-oplossing en homogeniseer.

Incubeer onder herhaald schudden, gedurende precies 1 uur bij de optimale werkteemperatuur (tijd en temperatuur nauwkeurig aanhouden).

Stop de reactie door 25,0 ml reagens van Luff-Schoorl toe te voegen en vul aan met water tot een totaal volume van 50 ml.

#### d. Bepaling van de hoeveelheid glucose

Bepaal de hoeveelheid glucose volgens 8.4.2.

Voer gelijktijdig een blancobepaling uit met dezelfde hoeveelheid filtraat en alle reagentia, doch met geïnactiveerd enzym (om het enzym inactief te maken, is verhitten van de enzymoplossing op 100 °C gedurende 10 min voldoende). Het zetmeel volgens Zulkowsky kan reducerende bestanddelen bevatten.

Stel aan de hand van de tabel vast met hoeveel mg glucose (g) het verschil tussen beide titratie-uitkomsten (uitgedrukt in ml 0,1000 N thiosulfaat) overeenkomt.

#### e. Berekening

Bereken de amyloglucosidase-activiteit in eenheden per mg ( $\mu$ mol glucose per min per mg) uit:

$$\frac{g}{c \cdot a}$$

waarin:

$g$  = hoeveelheid glucose uit de titratie gevonden, in mg

$a$  = hoeveelheid amyloglucosidase aan het incubatiemengsel toegevoegd, in mg

$c$  = 10,8  $\mu$ mol/min.mg.

6.4 Amyloglucosidase-oplossing: los op in (of verdun met) 10x verdunde acetaatbuffer (6.2), zoveel amyloglucosidase (6.3) als overeenkomt met 250 eenheden per ml. Bereid elke dag een verse oplossing.

6.5 Kaliumhexacyanoferraat(II)-oplossing 0,25 M (Carrez I): d.i. 106 g  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  per l.

6.6 Zinkacetaatoplossing 1 M in azijnzuur 0,5 M (Carrez II): d.i. 219,5 g  $Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$  en 30 g ijsazijn per l.

6.7 Jodiumoplossing 0,1 N: d.i. 12,7 g jodium en 24,0 g kaliumjodide (jodaatvrij) per l, volgens NEN 3102 onder 10. Verdun de oplossing voor het gebruik circa 10 maal.



## 6.8 Reagens van Luff-Schoorl:

Weeg af:

86,2 g natriumcarbonaat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), watervrij,  
31,3 g natriumwaterstofcarbonaat ( $\text{NaHCO}_3$ ),  
70,0 g trinatriumcitraat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  
25,0 g koper(II)sulfaat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), fijn poeder.

Meng de droge zouten goed en los het mengsel op onder voortdurend roeren in 800 ml koud water.

Vul aan tot 1 l. Het gebruikte water vrije natriumcarbonaat moet van te voren op gehalte worden gecontroleerd.

Het reagens moet na vijftigvoudige verdunning een pH hebben van  $10 \pm 0,2$ .

De werkzaamheid van het reagens kan worden gecontroleerd volgens 6.8.1.

### Opmerking

Voor het snel in oplossing brengen van de zouten kan het gebruik van een trilroerder nuttig zijn.

### 6.8.1 Controle van het reagens van Luff-Schoorl

Los op 9,500 g zuivere saccharose in een maatkolf van 500 ml, vul aan en meng.

Pipetteer hiervan 50 ml in een maatkolf van 500 ml. Voeg toe 15 ml zoutzuur 0,1 N. Breng de kolf met inhoud in een kokend waterbad en houd hem gedurende 30 min (te rekenen vanaf het ogenblik dat het water weer kookt) half ondergedompeld in het water. Koel daarna snel af tot circa  $20^\circ\text{C}$ . Neutraliseer met 15 ml natronloog 0,1 N, vul aan en meng. Bepaal in 25 ml van deze oplossing het reducerend vermogen volgens 8.4.

De reductie moet overeenkomen met  $19 \pm 0,1$  ml thiosulfaatoplossing 0,1 N.

## 6.9 Kooksteentjes: puimsteen of carborundumkorrels.

## 6.10 Kaliumjodide-oplossing 1,8 M: d.i. 300 g KI per l.

## 6.11 Zwavelzuur 3 M: d.i. 294 g $\text{H}_2\text{SO}_4$ per l.

## 6.12 Natriumthiosulfaatoplossing 0,1 N, volgens NEN 3102 onder 10.

## 6.13 Zetmeeloplossing 5 g/l (indicator), volgens NEN 3102 onder 7.3.

## 6.14 Zetmeeloplossing 30 g/l: los op 3,0 g zetmeel volgens Zulkowsky tot 100 ml.

## 7. Toestellen en hulpmiddelen

Gebruikelijk laboratoriumglaswerk en hulpmiddelen en in het bijzonder:

balans met een nauwkeurigheid van ten minste 1 mg,

roerapparaat, mechanisch of magnetisch,

laboratoriumcentrifuge met centrifugebuizen ca. 100 ml,

autoclaaf of hogedrukpan voor verhitting tot ten minste  $120^\circ\text{C}$ ,

waterbad met thermostaat voor een temperatuurbereik tot ten minste  $65^\circ\text{C}$ ,

terugvloei koelers,

metalen brandergaasjes, voorzien van asbestplaat met cirkelvormige opening, waarin de bodems van conische kolven van 300 ml juist passen.

## 8. Uitvoering

### 8.1 Extractie van de suikers

Weeg af 1,0 g van het monster tot op 1 mg en breng de afgewogen stof in een centrifugebuis. Voeg toe 50 ml ethanol 40% (V/V) en roer met behulp van het roerapparaat gedurende 15 min.

Centrifugeer en schenk de vloeistof af. Herhaal de extractie met ethanol 40% (V/V).

## 8.2 Ontsluiting van het zetmeel

Breng het residu kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml met ca. 30 ml water. Schud, om een zo regelmatig mogelijke verdeling van het monster te verkrijgen, de kolf krachtig om. Plaats de kolf ca. 5 min in een kokend waterbad en houd daarbij de inhoud voortdurend in beweging. Zet, nadat een zo goed mogelijke verdeling van het monster is bereikt, de maatkolf in een autoclaaf of hogedrukpan en verhit gedurende 2 uur bij 120 °C en een overdruk van 100 kPa (1 atm), of 1 uur bij ca. 130 °C en een overdruk van 180 kPa (1,8 atm).

## 8.3 Hydrolyse van het zetmeel

Neem de maatkolf uit de autoclaaf. Koel af, voeg toe 2,5 ml acetaatbuffer en verdun met water tot ca. 50 ml. Plaats de maatkolf in een waterbad, afgesteld op de optimale werkt temperatuur van het enzym, voeg toe 3 ml amyloglucosidase-oplossing en laat gedurende 1 uur incuberen onder herhaald schudden. Koel af, voeg toe 2 ml Carrez I en schud gedurende 1 min. Voeg dan toe 2 ml Carrez II en schud weer 1 min. Vul aan met water tot 100 ml, meng en filtreer door een vouwfilter. Controleer of al het zetmeel is omgezet. Kook hiertoe het residu met wat water op, koel af en voeg toe 1 tot 2 ml jodiumoplossing ca. 0,01 N (6.7). Er mag geen blauwkleuring optreden.

### Opmerking

Indien de oplossing blauw kleurt of blauwgekleurde stukjes bevat, begin de bepaling dan opnieuw. Ga in het eerste geval na, of de activiteit van de enzymoplossing juist is en in het tweede geval of de ontsluiting volgens voorschrift is uitgevoerd. Incubeer en/of ontsluit eventueel een uur langer.

## 8.4 Bepaling van de hoeveelheid glucose

Pipetteer 25 ml van het filtraat, of wel een kleiner volume dat ten hoogste 60 mg glucose bevat, in een conische kolf van 300 ml. Vul zo nodig met water aan tot 25 ml.

Pipetteer hierbij 25 ml van het reagens van Luff-Schoorl (6.8).

Verhit, na toevoeging van een paar kooksteentjes, uit de hand boven een vrije vlam van matige hoogte in ongeveer 2 min tot koken.

\* Plaats daarna de kolf onmiddellijk op een gereedstaand draadgaas met asbest-ring, waaronder tevoren een vlam is aangestoken, zodanig, dat de kolf alleen aan de onderzijde wordt verhit en sluit vervolgens een tevoren gereed gemaakte terugvloeikoeler aan. Kook vanaf dit ogenblik gerekend gedurende precies 10 min. Koel direct daarna af in koud water, waarbij schudden moet worden vermeden.

Titreer daarna als volgt:

Voeg aan de vloeistof 10 ml kaliumjodide-oplossing (6.10) toe en terstond daarna voorzichtig (CO<sub>2</sub>-ontwikkeling) 25 ml zwavelzuur (6.11).

Titreer het vrijgekomen jodium met thiosulfaat (6.12), op het eind met zetmeeloplossing (6.13) als indicator, tot roomgeel.

Voer een blancotitratie uit op een mengsel van 25 ml reagens Luff-Schoorl en dezelfde hoeveelheid filtraat als voor de bepaling gebruikt is, dit maal echter zonder koken.



Stel aan de hand van de tabel vast met hoeveel mg glucose (g) het verschil tussen de beide titratie-uitkomsten (uitgedrukt in ml 0,1000 N thiosulfaat) overeenkomt.

*Opmerking*

Deze z.g. "koude blanco" dient om storingen van bepaalde stoffen die geen suiker zijn, uit te sluiten.

Tabel voor 25 ml reagens volgens Luff-Schoorl  
10 min kooktijd

thiosulfaat 0,1 N ml	glucose $C_6H_{12}O_6$	
	mg	verschil
1	2,4	2,4
2	4,8	2,4
3	7,2	2,5
4	9,7	2,5
5	12,2	2,5
6	14,7	2,5
7	17,2	2,6
8	19,8	2,6
9	22,4	2,6
10	25,0	2,6
11	27,6	2,7
12	30,3	2,7
13	33,0	2,7
14	35,7	2,8
15	38,5	2,8
16	41,3	2,9
17	44,2	2,9
18	47,1	2,9
19	50,0	3,0
20	53,0	3,0
21	56,0	3,1
22	59,1	3,1
23	62,2	

9. Berekening

Bereken het gehalte aan zetmeel, in  $\%(m/m)$ , uit

$$\frac{e \cdot g}{m \cdot V}$$

waarin:

$m$  = afgewogen hoeveelheid analysemateriaal, in g

$g$  = hoeveelheid glucose uit de titratie gevonden, in mg

$V$  = het voor de titratie gepipetteerde volume, in ml.

$e$  = 9 ml.

10. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen de resultaten van twee bepalingen, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd door dezelfde persoon, mag niet meer bedragen dan 0,5% absoluut + 1% van de gemiddelde waarde.

11. Verslag

Vermeld in het verslag:

Het gehalte aan zetmeel als gemiddelde van twee bepalingen tot op 0,1%.

De gevolgde methode door de vermelding: volgens NEN 3574.

---

Titels van vermelde normen

NEN 2560 - Controlezeven. Draadzeven en plaatzeven met ronde en vierkante gaten

NEN 3102 - Chemische analyse. Laboratoriumbenodigdheden, reagentia en hulpstoffen

NEN 3328 - Veevoeders. Richtlijnen voor de behandeling van monsters.

---

Normcommissie 370 99 "Onderzoekingsmethoden voor veevoeders"

---

Niets uit deze norm mag worden veelelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotocople, microfilm of op welke andere wijze ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van het NNI.

---

Nederlands Normalisatie-instituut

Polakweg 5, Rijswijk (ZH), telefoon (070) 90 68 00\*, telex 32123, postrekening 25301.